



JOURNAL OF THE
**Selva Andina
Animal Science**
Official Journal of the Selva Andina Research Society

Tópicos Especiales

ISSN 2311-3766 (print edition)
JSAAS
ISSN 2311-2581 (online edition)

Características bioquímicas del plasma seminal intrauterino poscoital en llamas (*Lama glama* L.)

Biochemical characteristics of postcoital intrauterine seminal plasma in llamas (*Lama glama* L.)

Marino-Poma Magdalena^{1*}, Loza-Murguía Manuel Gregorio^{1,2,3}, Paxipati-Parra Rolando Cesar¹

Datos del Artículo

¹Universidad Católica Boliviana San Pablo - UCBSP.

Unidad Académica Campesina Tiahuanacu. UAC-T. Ingeniería Zootécnica. Km 74. Carretera Internacional La Paz-Desaguadero.

Tel +591-2-2895100. La Paz, Estado Plurinacional de Bolivia.

²Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP. Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP, Ingeniería Agronómica. Coroico-Nor Yungas-La Paz, Bolivia. +591(2)8781991.

³Departamento de Enseñanza e Investigación en Bioquímica & Microbiología- DEI&BM. Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP-UCBSP. boliviamanloza@yahoo.com

*Dirección de contacto:

Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP. Unidad Académica Campesina Tiahuanacu UAC-T. Ingeniería Zootécnica. Km 74. Carretera Internacional La Paz-Desaguadero. Tel: +591-73091175 - 2895100.

Magdalena Marino Poma

E-mail address :

marinomagdalenaucb@gmail.com

Palabras clave:

Plasma seminal, llamas, componentes bioquímicos.

J. Selva Andina Anim. Sci.
2019; 6(1):17-23.

Historial del artículo.

Recibido junio, 2018.

Devuelto septiembre 2018

Aceptado diciembre, 2018.

Disponible en línea, abril, 2019.

Editado por:
**Selva Andina
Research Society**

Key words:

Seminal plasma, llamas, biochemical components.

Resumen

Los intentos de criopreservar semen en camélidos sudamericanos, han sido hasta la fecha insatisfactorios. Falta información acerca de los componentes bioquímicos del semen eyaculado y su alta viscosidad que impide el aprovechamiento de material genético. El objetivo de esta investigación se centró en analizar la composición del plasma seminal intrauterino y por aspiración poscoital en llamas. Se seleccionaron 6 llamas machos de 3 y 4 años de edad, la colección de semen fue realizada por aspiración poscoital con el proctoscopio de uso humano, depositado en un tubo falcón de 14 mL después de la cópula. El semen se centrifugo a 2800 rpm/15 min, para posterior análisis en laboratorio se utilizaron kits comerciales (Beckman Coulter y Medicon), y dos analizadores automáticos (Beckman Sxjncron Cx7 Deltay Pictus 500 Diatron). Para el análisis de los datos se realizó mediante la prueba de t-Student. No hubo diferencia estadística para las concentraciones de albúmina, glucosa, triglicéridos, proteína total, micro proteína, colesterol, fosfatasa alcalina, sodio, calcio y magnesio entre edades (p 0.05), la concentración de potasio reporto los valores de 10.8 ± 0.56 y 9.76 ± 0.64 mEq/L, siendo estadísticamente diferentes entre edades (p 0.05). Los resultados de la investigación permiten trabajar con llamas de 3 y 4 años de edad para donadores de semen en programas de inseminación artificial con semen fresco.

© 2019. Journal of the Selva Andina Animal Science. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Attempts to cryopreserve semen in southamerican camelids have so far been unsatisfactory. There is a lack of information about the biochemical components of ejaculated semen and its high viscosity that prevents the use of genetic material. The objective of this research was to analyze the composition of the intrauterine seminal plasma and by post-coital aspiration in llamas. Six male 3 and 4 year old llamas were selected, the collection of semen was made by post-coital aspiration with the proctoscope of human use, deposited in a falcon tube of 14 mL after copulation. The semen was centrifuged at 2800 rpm/15 min, for later analysis in the laboratory, commercial kits (Beckman Coulter and Medicon), and two automatic analyzers (Beckman Sxjncron Cx7 Deltay Pictus 500 Diatron) were used. For the analysis of the data, it was carried out using the t-Student test. There was no statistical difference for the concentrations of albumin, glucose, triglycerides, total protein, micro protein, cholesterol, alkaline phosphatase, sodium, calcium and magnesium between ages (p 0.05), the potassium concentration reported values of 10.8 ± 0.56 and 9.76 ± 0.64 mEq / L, being statistically different between ages (p 0.05). The results of the research allow us to work with 3- and 4-year-old llamas for semen donors in artificial insemination programs with fresh semen.

© 2019. Journal of the Selva Andina Animal Science. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

El semen representa aproximadamente 5% de espermatozoides y 95% de plasma seminal (PS), que se atribuye a la secreción de las glándulas sexuales accesorias (GSA), cuya utilidad radica en las tecnologías de reproducción asistida (TRA).¹

El PS, una compleja fracción del semen, en la que se suspenden los espermatozoides en el momento de la eyaculación, constituyendo el volumen mayor del semen² sus componentes bioquímicos que secretan las GSA del tracto reproductivo masculino³ pH que varía según la especie, en toros y carnero ligeramente ácido y camélido ligeramente alcalino.

Los espermatozoides suspendidos en PS, un fluido de composición compleja, difiere por la presencia de proteínas, iones, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, poliaminas, prostaglandinas, y hormonas esteroideas, siendo su función principal, vehículo que irriga la uretra y al mismo tiempo impulsa los espermatozoides a través del tracto genital durante la eyaculación, otras funciones atribuibles, son el transporte, protección y nutrición de los espermatozoides en aparato reproductor femenino, regulando a su vez la capacitación, reacción del acrosoma y la interacción entre gametos.^{3,4}

Las GSA como vesícula seminal, próstata y vesículas bulbouretrales, aportan la mayor parte del volumen eyaculado y secreción de la vesícula seminal, constituye la mayor parte del PS.⁵ En un principio, se creía que estas GSA, podrían ser anatómica y funcionalmente similares en rumiantes y camélidos, sin embargo con el descubrimiento e identificación de varias sustancias en la secreción, tales como el ácido cítrico, fosfatasa prostática, fructuosa y fosforilcolina⁶, dio lugar al estudio de las diferentes actividades químicas secretoras, y su rol posible para los espermatozoides.

Como consecuencia, la función del PS, en la regulación de los procesos reproductivos, que garanticen el éxito en la fecundación ha sido descuidado en gran medida, aunque los componentes del PS tienen gran valor diagnóstico, como la medición de los niveles de fructuosa para anomalías en las vesículas seminales¹, la medición de la fosfatasa ácida prostática, por la presencia de secreciones⁷, su compleja composición proteómica, factores de crecimiento, transcripción, nutre y protegen a los espermatozoides mientras viajan desde el macho al tracto reproductivo de la hembra, lo que garantiza la interacción con el ovocito, dando lugar a la fertilización.⁸ Más aun, la presencia de proteínas específicas de tejido en PS, útiles como biomarcadores potenciales para la evaluación de la fertilidad masculina.⁹

Las diferencias en los componentes del PS, pueden deberse a variaciones de la alimentación, exposición al medio ambiente, manejo y métodos de identificación, además de los cambios provocados por acción enzimática posteriores a la eyaculación y actividad metabólica de los espermatozoides suspendidos.

Por lo anterior esta investigación se centra en analizar la composición del plasma seminal intrauterino y por aspiración poscoital en llamas como apoyo en programas de mejoramiento genético.

Materiales y métodos

Localización del trabajo de campo. Se realizó en predios del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu. Universidad Católica Boliviana San Pablo, ubicada en el municipio de Tiahuanacu, Provincia Ingavi del departamento de La Paz, a 72 km de la ciudad de La Paz sobre la carretera Internacional La

Paz-Desaguadero, entre las coordenadas 17° 35' a 18° 17' de Latitud Sur y 68° 20' a 69° 08' de Longitud Oeste y a una altitud de 3854 msnm.¹⁰

Se utilizaron 18 llamas de la raza Q'ara, 6 machos de 3 a 4 años de edad (donadores de semen) y 12 llamas hembras de 4 a 5 años de edad (receptivas), los machos se adquirió del Municipio Santiago de Machaca de provincia José Manuel Pando, se seleccionaron bajo los siguientes criterios: características fenotípicas como (talla tamaño testicular y liberación completa del pene), las hembras fueron adquiridas del municipio de San Adres de Machaca provincia Ingavi, los criterios fueron: hembras vacías, condición corporal de grado 3 (ideal), posteriormente fueron transportadas a la Unidad Académica Campesina Tiahuanacu.

Se puso en cuarentena a todos los animales durante 15 días, para evitar algún tipo de contagio de enfermedades, la primera semana, se desparasito con PARAMEC 20 LA con una dosis de 1 mL/50 kg de PV por vía sub cutánea.

La etapa de acostumbramiento. Durante dos semanas los animales se adaptaron al tipo de alimentación y manejo. Las hembras fueron nuevamente seleccionadas por el método de receptibilidad, o de aceptación al macho, sujetadas en posición de cubito ventral con una soga, posteriormente se sujetó la cola en el lado izquierdo de la caja pélvica para facilitar la copula, previa limpieza de la región de la vulva con papel toalla, para la colección de semen poscoital.

La colección de semen se realizó por la técnica de aspiración poscoital, que consiste en aspirar parte del semen que el macho eyaculado en la cavidad cervical y uterina de la hembra.¹¹

Las muestras de semen fresco fueron pesadas en una balanza, para una cantidad equilibrada luego fueron centrifugadas a 2800 rpm/15 min, en una centrifu-

gadora automática (DYNAC II y BLANK STRIP) para la separación del PS. El sobrenadante obtenido fue evaluado para determinar la ausencia de espermatozoides. Se obtuvo un aproximado de entre 1 a 2 mL de PS para su análisis.

Análisis de los parámetros bioquímicos, niveles de albúmina, glucosa, proteína total y micro proteína, ácidos grasos, colesterol, triglicéridos, fosfatasa alcalina, se utilizaron kits comerciales para cada determinación (Beckman Coulter Life Science) en un analizador automático (Beckman Synchron CX 7 A).

Para los iones orgánicos (potasio, sodio, calcio y magnesio) se utilizaron kits comerciales MEDICON, para su determinación y de un analizador automático (Pictus 500 Diatron).

Los resultados se expresan como medias y desviaciones estándares. Las diferencias estadísticas entre sus valores fueron determinadas con la prueba de t-Student a un nivel de significancia de ($p < 0.05$).¹²

Resultados

Discusión

El amplio rango de componentes presentes en el PS, en llamas de 3 y 4 años de edad, resulta compleja su evaluación, al ser influido por factores como la dieta, manejo, grado de fecundidad. El rendimiento reproductivo de los camélidos sudamericanos (CSA), es un proceso que resulta en la culminación de procesos anatómicos, fisiológicos, y otros que a la larga repercuten en la calidad del semen y por ende del plasma seminal.¹³ La disponibilidad de semen de calidad resulta de una acción coordinada, espermatogénesis, maduración, transito epididimal, y composición del PS.¹⁴

Tabla 1 Composición de plasma seminal eyaculado a nivel intrauterino en llamas de 3 y 4 años de edad

Componentes	Llamas de 3 años de edad			Llamas de 4 años de edad		
	macho 1	macho 2	macho 3	macho 4	macho 5	macho 6
Proteína total (g/dL)	0.9	1.25	0.85	0.85	1.25	1.25
Micro proteína (mg/dL)	606	644	731	623.5	642.5	643
Colesterol (mg/dL)	0	0	0	0	1	0
Triglicéridos (mg/dL)	118	104.5	115	108	102	108.5
Potasio (mEq/L)	10.6	10.5	11.3	9.3	9.8	10.2
Sodio (mEq/L)	141.6	148.5	143.05	144	143.5	128
Calcio (mEq/L)	10.85	11.15	11.35	10.6	11.35	10.45
Magnesio (mg/dL)	3.55	2.55	2.55	3	3.65	3.65
Fosfatasa alcalina (IU/L)	107	140	114	151	142	164.5

Tabla 2 Composición del plasma seminal eyaculado a nivel intrauterino en llamas (Promedio \pm DS)

Componentes	llamas de 3 años		llamas de 4 años		llamas de 3 y 4 años	
	Promedio	DS \pm	Promedio	DS \pm	Promedio general	DS \pm
Albúmina (g/dL)	1.3	0.42	0.85	0.30	1.08	0.36
Glucosa (mg/dL)	12.67	3.33	12.50	1.05	12.58	2.19
Proteína total (g/dL)	1	0.22	1.45	0.56	1.23	0.39
Micro proteína (mg/dl)	660.5	87.12	636.3	75.01	648.4	81.07
Colesterol (mg/dL)	0	0	0.17	0.41	0.08	0.2
Triglicéridos (mg/dL)	115.83	10.44	106.17	12.84	111	11.64
Potasio (mEq/L)	10.80a	0.56	9.77b	0.64	10.29	0.6
Sodio (mEq/L)	144.38	4.44	138.5	12.21	141.44	8.33
Calcio (mg/dL)	11.12	0.57	10.8	0.56	10.96	0.57
Magnesio (mg/dL)	2.88	0.71	3.43	0.68	3.16	0.7
Fosfatasa alcalina (IU/L)	120.33	22.86	152.5	43.31	136.42	33.08

a,b = Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencia estadística (p < 0.05). DS \pm = Desviación estándar

El contenido proteico del PS, es variado y muchas de estas son producto de la secreción epididimal y vesículas seminales¹⁵ una intensa investigación sobre las proteínas contenidas en PS ha sido motivo de discusión, señalando que estas tiene la capacidad de protección, en particular las de bajo peso molecular contra el choque frio y actividad antioxidante de los espermatozoides.¹⁶

La adición o eliminación de una variedad de proteínas durante la maduración y la eyaculación, juegan un rol importante en la maduración y mantenimiento de la membrana plasmática del espermatozoide¹⁷ motilidad^{18,19} Capacitación²⁰ interacción espermatozoide y fertilización.²¹

Si bien nuestros datos no revelan que proteínas han sido cuantificadas en el PS, podemos apreciar que la

presencia de albuminas, micro proteína y proteínas totales, con valores medios comprendidos con los autores de referencia, corroboraría las funciones mencionadas que a la larga inciden en estos procesos.

La glucosa como principal azúcar en PS, se convierte en fructosa a través de sorbitol deshidrogenasa y aldolasa reductasa²² su concentración se ha utilizado a menudo como indicador del estado androgénico del animal, ya que su secreción está estrictamente relacionada con el nivel de andrógenos en sangre.²³

Los componentes en el PS, en especial Ca, Na, colesterol, triglicéridos no hubo diferencias significativas en las dos edades estudiadas tabla 1 y 2, estudios realizados, si bien no hubo diferencias significativas entre los componentes analizados, el Mg,

Ca, Na, K y PT, estos ejercen un equilibrio osmótico, además de ser componentes de muchas enzimas²⁴ también se ha observado una correlación negativa entre la motilidad espermática y la concentración de Na y K.^{25,26} Estudios en espermatozoides humanos han señalado que un alta concentración de sodio y/o potasio en PS, pueden inducir la peroxidación de los lípidos de membrana del espermato²⁷ un inhibidor metabólico natural y una concentración mayor de K, disminuye el metabolismo y motilidad del espermato²⁸ varios estudios reportaron una relación de la PT en el semen fresco con su calidad.^{29,30} Nuestros datos en cuanto al Na/K con relación a los autores señalados distan en valores referidos, pero no podemos dejar de lado que argumentos de esta naturaleza inciden al final de los procesos de la calidad del semen y por ende del PS.

Finalmente, los valores de los componentes estudiados en el PS, son una orientación de lo que está sucediendo en estos camélidos sin descartar la posibilidad de que las muestras tuvieron procesos de evaluación y muestreo diferentes a trabajo similares, y que si bien este es el inicio en estas actividades debemos unificar metodologías de muestreo en el área rural del altiplano boliviano con el fin de garantizar la calidad del semen fresco y la importancia que este tiene en los procesos reproductivos.

Conflictos de intereses

La presente investigación ha cumplido normas éticas en el manejo de los animales, declaramos que no existen conflictos de interés.

Agradecimientos

Nuestro reconocimiento profundo a los responsables del Laboratorio de Biotecnología reproductiva de la

Unidad Académica Campesina Tiahuanacu. A los Comunarios de las comunidades del Municipio Santiago de Machaca de provincia José Manuel Pando, San Adres de Machaca provincia Ingavi por proporcionarnos los animales para el presente trabajo de investigación.

Aspectos Éticos

La investigación ha sido aprobada por el Comité de Ética e Investigación de la Unidad Académica Campesina Tiahuanacu y siguió las pautas establecidas para este comité.

Literatura citada

1. Gonzales GF, Villena A. True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. *Int J Androl*. 2001;24(5):255-60. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1046/j.1365-2605.2001.00306.x>
2. Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci* 2007; 98(3-4): 169-88. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.012>
3. Mann T, Lutwak Mann C. Male reproductive function and semen. *Andrologia* 1982; 14(1):76-6. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0272.1982.tb03098.x>
4. Töpfer Petersen E, Waberski D, Hess O, Bellair S, Schambony A, Ekhlasi-Hundrieser M, et al. The role of seminal plasma in fertilization. *Tierärztliche Umschau* 1998; 53 447-54.
5. Metafora S, Peluso G, Persico P, Ravagnan G, Esposito C, Porta R. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein se-

- creted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochem Pharmacol* 1989;38(1):121-31. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90158-5](https://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(89)90158-5)
6. Mann T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. 2nd ed. London, United Kingdom: Methuen; 1964.
 7. Drake RR, White KY, Fuller TW, Igwe E, Clements MA, Nyalwidhe JO, et al. Clinical collection and protein properties of expressed prostatic secretions as a source for biomarkers of prostatic disease. *J Proteomics* 2009;72(6):907-17. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.007>
 8. Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2005;322(1):43-52. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1007/s00441-005-1127-3>
 9. Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol* 2014;11(5):278-88. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1038/nrurol.2014.74>
 10. Plan de Desarrollo Municipal Tiahuanacu. Gobierno Autónomo Municipal de Tiahuanacu; 2011. p. 155.
 11. Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 1997;47(3): 619-26. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00020-4](https://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00020-4)
 12. Pearson ES. Student' as statistician. *Biometrika* 1939;30(3-4): 210-50. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/biomet/30.3-4.210>
 13. Van Saun RJ. Effect of nutrition on reproduction in llamas and alpacas. *Theriogenology* 2008; 70(3):508-14. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.025>
 14. Goeritz F, Quest M, Wagener AW, Fassbender MF, Broich A, Hildebrandt TB, et al. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology* 2003;59(7):1487-502. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01201-3](https://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01201-3)
 15. Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1990;26(4):313-8. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1002/mrd.1080260404>
 16. Muño Blanco T, Pérez Pé R, Cebrián Pérez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim* 2008; 43(Suppl 4): S18-31. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x>
 17. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II *J Biol Chem* 1994; 269(8): 5776-80.
 18. Henricks DM, Kouba AJ, Lackey BR, Boone WR, Gray SL. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol Reprod* 1998;59(2):330-7. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1095/biolreprod59.2.330>
 19. Sanchez Luengo S, Aumüller G, Albrecht M, Sen PC, Röhm K, Wilhelm B. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. *J Androl* 2004; 25(2): 234-44. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02783.x>
 20. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59(4): 768-76.

- DOI: <https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod59.4.768>
21. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994;2(4):371-2. DOI: <https://dx.doi.org/10.1017/S0967199400002240>
 22. Agarwal VK, Ram L, Rai AK, Khanna ND, Agarwal SP. Physical and biochemical attributes of camel semen. *J Camel Sci.* 2004; 1: 25-30.
 23. Mann T, Lutwak Mann C. Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin: Springer-Verlag; 1981. p. 495.
 24. Cevik M, Tuncer PB, Ta demer U, Özgürtas T. Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. *Turk J Vet Anim Sci* 2007; 31(6): 381-7.
 25. Mosaferi S, Niasari Naslaji A, Abarghani A, Gharahdaghi AA, Gerami A. Biophysical and biochemical characteristics of bactrian camel semen collected by artificial vagina. *Theriogenology* 2005;63(1):92-101. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.021>
 26. Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Rum Res* 2002;44(2): 153-8. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00051-2](https://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00051-2)
 27. Love CC, Kenney RM. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 1998;50(6):955-72. DOI: [http://www.dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00199-X](http://www.dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00199-X)
 28. Massányi P, Trandzik J, Nad P, Toman R, Skalická M, Koréneková B. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian J Androl* 2003;5(2):101-4. DOI: <https://dx.doi.org/10.1081/ESE-200056166>
 29. Ashworth PJ, Harrison RA, Miller NG, Plummer JM, Watson PF. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1994;6(2):173-80. DOI: <https://dx.doi.org/10.1071/RD9940173>
 30. Barrios B, Perez Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino Blanco T, et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 2000;63(5):1531-7. DOI: <https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1531>